

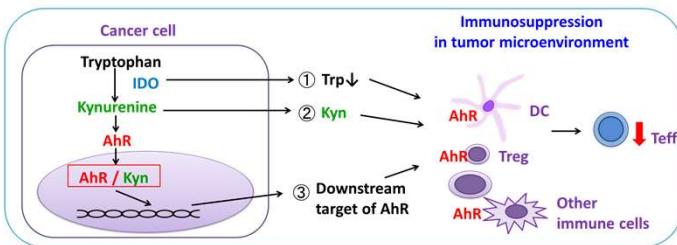


抗腫瘍免疫療法増強剤

慶應義塾大学医学部 塚本信夫

背景と概要

Tryptophan代謝酵素IDO(indoleamine 2, 3-dioxygenase)はがん患者において免疫抑制に働く主要な因子であり、その酵素活性を阻害する阻害薬が製薬企業によって開発され世界各国で臨床試験が行われている。IDOがTryptophanを代謝して作られるKynurenin(Kyn)は、リガンド依存性転写因子AhR(Aryl hydrocarbon receptor)にリガンドとして結合し、転写を活性化させる。従来、このIDO-Kyn-AhR経路はがん微小環境において、①Tryptophanが枯渇しT細胞が疲弊する、②がん細胞から放出されたKynが免疫細胞のAhRに作用し抑制性免疫細胞に変化させる、という2つの機構で免疫抑制に関わることが知られていた。我々の研究から、③がん細胞中で活性化したAhRの下流で発現する分子による免疫抑制が大きく関わっていることが明らかになった(Fig.1)。本発明では、AhR下流で免疫抑制に関わる標的遺伝子を明らかにし、さらにその発現誘導にはAhR経路とIDOリン酸化が関わることを示し、新たな抗腫瘍免疫増強法を開発した。



発明の内容

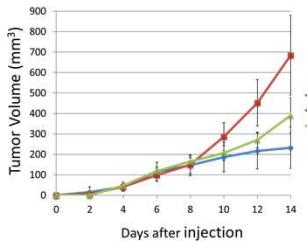


Fig.2 IDOおよび活性化型AhRによる腫瘍増殖促進
IDO1あるいは活性化型AhRを発現したマウスがん細胞MCA205はmockに比べて腫瘍増殖を促進した。免疫学的解析から、がん細胞に発現した活性化型AhRは免疫抑制を誘導することが示された。

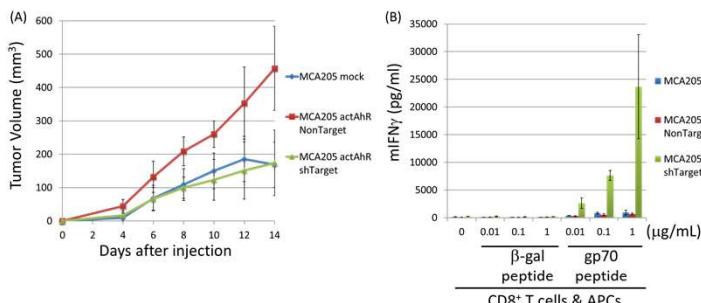


Fig.3 AhR下流の標的分子のノックダウンによる抗腫瘍免疫の増強
(A) がん細胞に発現した活性化型AhRによる腫瘍増殖の促進は、AhRの下流標的分子のノックダウンによりキャンセルされた。(B) CD8 $^+$ T細胞からのがん抗原特異的IFN- γ 产生は、がん細胞に発現した活性化型AhRにより低下し、AhRの下流標的分子のノックダウンにより激しく增强されたことから、この下流標的分子ががん細胞内に活性化したAhRによる免疫抑制を担うことが示された。

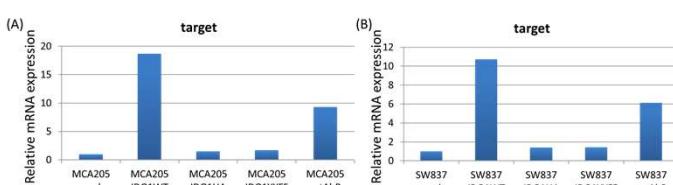


Fig.4 AhR下流の標的分子はがん細胞に発現したIDOにより誘導され、その誘導はIDOの酵素活性阻害により失われる
マウスがん細胞株MCA205(A)あるいはヒトがん細胞株(B)に野生型IDO1あるいは活性化型AhRを発現させることにより、AhRの下流標的分子の発現が誘導されたが、酵素活性の無いIDO1HA変異体あるいは2箇所のリン酸化部位を変異させたIDO1YFF変異体は、AhRの下流標的分子の発現をほとんど誘導できなかった。これらはAhR下流の免疫抑制をIDO1リン酸化の阻害によっても解除できることを意味する。

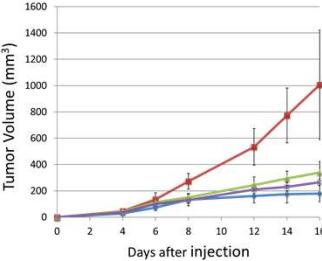


Fig.5 IDO1リン酸化の阻害は酵素活性の阻害と同様にIDO1による腫瘍増殖促進を抑制する
IDO1による腫瘍増殖促進は酵素活性を失う変異HAと同様にリン酸化部位の変異YFFFによって失われた。

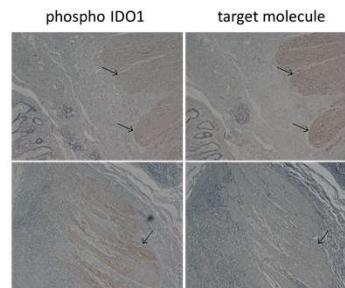


Fig.6 大腸がん組織でのIDO1リン酸化部位はAhRの標的分子発現部位と一致する

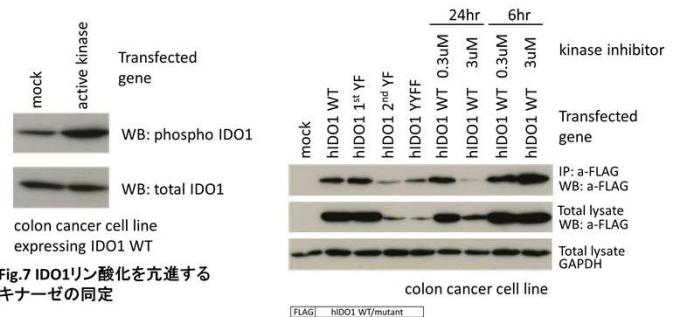


Fig.7 IDO1リン酸化を亢進するキナーゼの同定

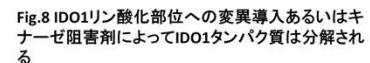


Fig.8 IDO1リン酸化部位への変異導入あるいはキナーゼ阻害剤によってIDO1タンパク質は分解される

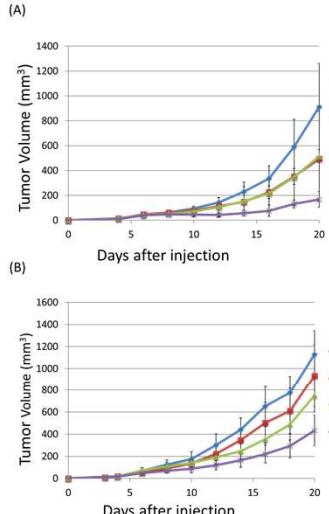
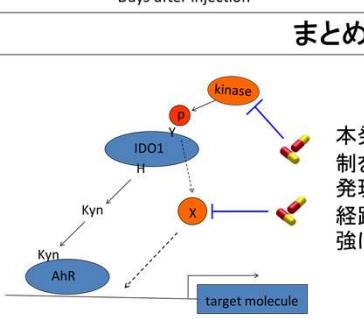


Fig.9 キナーゼ阻害剤と抗PD-1抗体は相乗的に腫瘍増殖を抑制する
(A) IDO1陽性がん細胞MC38
(B) IDO1を発現させたMCA205



まとめ

本発明では、AhRの下流で免疫抑制を担う標的分子を見出し、その発現誘導に関わるIDO1リン酸化経路の阻害が、抗腫瘍免疫の増強に有効であることを示した。



ANTI-TUMOR IMMUNOTHERAPY ENHANCER

School of Medicine, Keio University Nobuo Tsukamoto

Background and abstract

Tryptophan metabolic enzyme IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) is one of the major immunosuppressive factors in cancer patients, and several enzymatic inhibitors developed by pharmaceutical companies are under evaluation in clinical trials worldwide. However, enzymatic inhibition of IDO is not enough to show good clinical outcome. Kynurenines (Kyns) produced by IDO from tryptophan, bind to ligand-dependent transcription factor AhR (Aryl hydrocarbon receptor) and activate its transcription. Two mechanisms of immune suppression were reported for the IDO-Kyn-AhR pathway; 1) Tryptophan-depletion by IDO, 2) Induction of suppressive phenotype in immune cells by Kyn released from cancer cells. From our study, a novel mechanism of immune suppression was identified; 3) Suppression through downstream molecules of AhR in cancer cells (Fig.1). In this invention, we identified a downstream target of AhR responsible for immune suppression, and showed that the IDO phosphorylation was involved in the induction of the target of AhR. Based on this finding, we developed a novel method for enhancing anti-tumor immunotherapy.

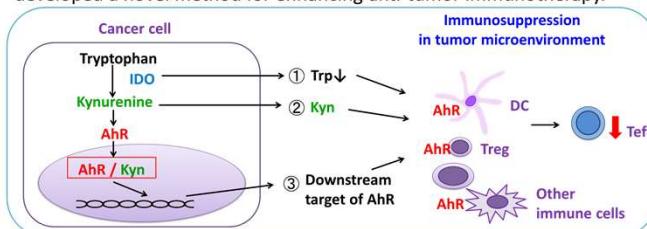


Fig.1 Three mechanisms of immunosuppression mediated by IDO

contents of invention

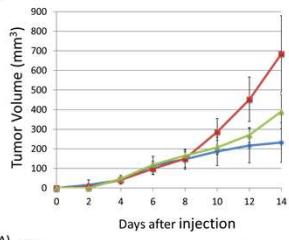


Fig.2 Tumor growth promotion by IDO and constitutively active AhR
IDO1 or constitutively active AhR (actAhR) expressed in mouse cancer cells promoted tumor growth. Immunological analysis indicated actAhR expressed in cancer cells induced immunosuppression.

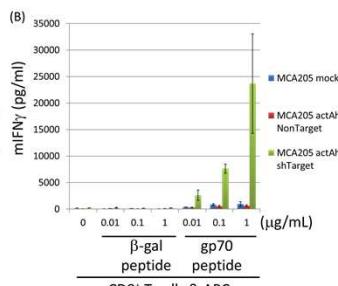
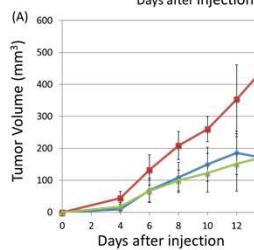


Fig.3 Enhancement of anti-tumor immunity by knockdown of a downstream target molecule of AhR

(A) Tumor growth promotion by active AhR was cancelled by knockdown of a downstream target of AhR. (B) Cancer antigen-specific IFN- γ production from CD8 $^{+}$ T cells was decreased by active AhR expressed in cancer cells, but was strongly enhanced by knockdown of a downstream target molecule AhR. This indicates that this downstream target molecule mediates immunosuppression by activated AhR.

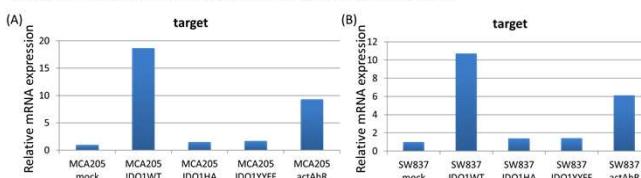


Fig.4 The downstream target molecule of AhR was induced by IDO expressed by cancer cells and this induction was cancelled by inhibition of enzymatic activity or phosphorylation of IDO.

Expression of wild type IDO1 or active AhR in mouse cancer cell line (A) or human cancer cell line (B) induced expression of the downstream target of AhR, but IDO1 HA mutant which has no enzymatic activity or IDO1 YFFF mutant which lost two phosphorylation sites almost lost induction of the downstream target of AhR. This indicates inhibition of IDO1 phosphorylation can cancel the immunosuppression mediated by the downstream molecule of AhR.

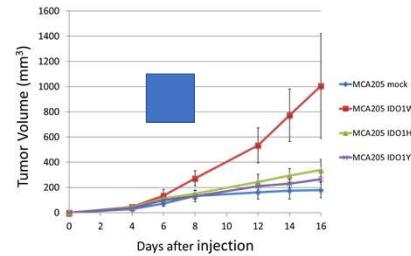


Fig.5 Inhibition of IDO1 phosphorylation inhibit IDO1-mediated tumor growth promotion
IDO1YYFF mutant as well as catalytic activity deficient IDO1HA mutant lost IDO1-mediated tumor growth promotion.

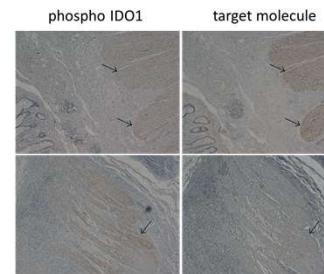


Fig.6 IDO1 phosphorylation co-localized with the target molecule of AhR in colon cancer tissues

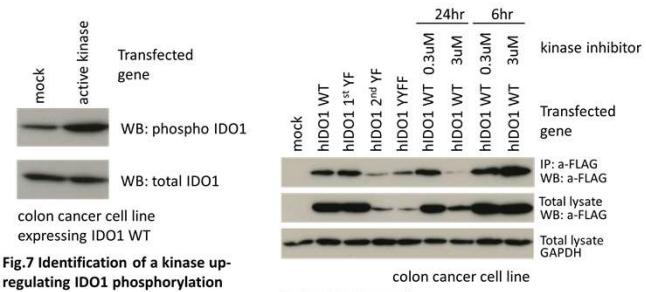


Fig.7 Identification of a kinase up-regulating IDO1 phosphorylation

IP: a-FLAG WB: a-FLAG

Total lysate WB: a-FLAG

Total lysate GAPDH

Transfected gene

24hr 6hr kinase inhibitor

mock hIDO1 WT hIDO1^{1st} YF hIDO1 WT 0.3μM hIDO1 WT 3μM hIDO1 WT 0.3μM hIDO1 WT 3μM

WB: phospho IDO1

WB: total IDO1

colon cancer cell line expressing IDO1 WT

WB: a-FLAG

Total lysate WB: a-FLAG

Total lysate GAPDH

Transfected gene

24hr 6hr kinase inhibitor

mock hIDO1 WT hIDO1^{1st} YF hIDO1 WT 0.3μM hIDO1 WT 3μM hIDO1 WT 0.3μM hIDO1 WT 3μM

WB: phospho IDO1

WB: total IDO1

colon cancer cell line expressing IDO1 WT

WB: a-FLAG

Total lysate WB: a-FLAG

Total lysate GAPDH

Transfected gene

24hr 6hr kinase inhibitor

mock hIDO1 WT hIDO1^{1st} YF hIDO1 WT 0.3μM hIDO1 WT 3μM hIDO1 WT 0.3μM hIDO1 WT 3μM

WB: phospho IDO1

WB: total IDO1

colon cancer cell line expressing IDO1 WT

WB: a-FLAG

Total lysate WB: a-FLAG

Total lysate GAPDH

Transfected gene

24hr 6hr kinase inhibitor

mock hIDO1 WT hIDO1^{1st} YF hIDO1 WT 0.3μM hIDO1 WT 3μM hIDO1 WT 0.3μM hIDO1 WT 3μM

WB: phospho IDO1

WB: total IDO1

colon cancer cell line expressing IDO1 WT

WB: a-FLAG

Total lysate WB: a-FLAG

Total lysate GAPDH

Transfected gene

24hr 6hr kinase inhibitor

mock hIDO1 WT hIDO1^{1st} YF hIDO1 WT 0.3μM hIDO1 WT 3μM hIDO1 WT 0.3μM hIDO1 WT 3μM

WB: phospho IDO1

WB: total IDO1

colon cancer cell line expressing IDO1 WT

WB: a-FLAG

Total lysate WB: a-FLAG

Total lysate GAPDH

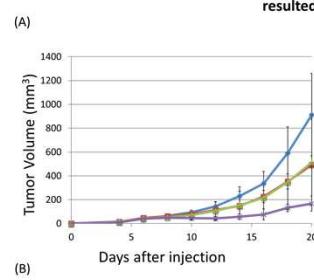


Fig.8 Mutations at phosphorylation residues of IDO1 or treatment with an inhibitor of the kinase resulted in down-regulation of IDO1 proteins

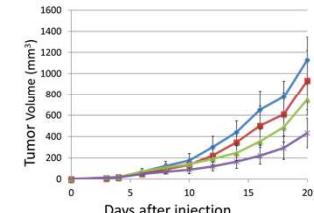
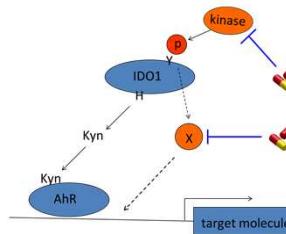


Fig.9 Kinase inhibitor and anti-PD1 antibody synergistically inhibited tumor growth

(A) MC38 endogenously expressing IDO1
(B) MCA205 over-expressing IDO1

SUMMARY



In this invention, a downstream target molecule of AhR which mediates immunosuppression was identified and it was shown that inhibition of IDO1 phosphorylation pathway involved in the up-regulation of the target molecule is effective to enhance anti-tumor immune response.